

羊栖菜多糖通过激活 Caspase 途径诱导 Lovo 细胞凋亡

严璘璘 梁倩* 李继承**

(浙江大学细胞生物学研究所, 杭州 310031)

摘要 研究了羊栖菜多糖(*Sargassum Fusiforme* Polysaccharides, SFPS)诱导人大肠癌 lovo 细胞凋亡及凋亡过程中 caspase-3、caspase-8、caspase-9 的活性变化。MTT 法检测 SFPS 对 lovo 细胞增殖的抑制率; 通过电镜、琼脂糖凝胶电泳、流式细胞术鉴定细胞凋亡; 应用 Western 印迹法测定 caspase-3 酶原和 caspase-9 的变化; RT-PCR 检测 caspase-3 mRNA 表达; caspase-3、caspase-8、caspase-9 活性检测试剂盒观察 caspase-3、caspase-8、caspase-9 的活性改变。结果显示, SFPS 对 lovo 细胞增殖有显著抑制作用, 经形态变化、DNA 条带和流式细胞分析, 可见明显的细胞凋亡特征。SFPS 处理 lovo 细胞后, 发现 caspase-3 酶原蛋白表达降低, caspase-3 mRNA 高表达, 并具有剂量和时间的依赖性。而在检测蛋白中, 也发现 caspase-9 被激活进而形成具有活性的片段。另外, caspase 的活性检测也进一步发现 caspase-3、caspase-9 的活性逐步增高。实验结果提示 SFPS 在体外诱导 lovo 细胞凋亡, 这可能是 SFPS 抑制肿瘤增殖的机制之一, 并且是通过激活启动 caspase-9, 进而激活下游效应 caspase-3 的级联反应来实现的。

关键词 羊栖菜多糖; lovo 细胞; 凋亡; caspase-3、caspase-8 和 caspase-9

目前, 对多糖抗肿瘤作用的研究引起了国内外学者的广泛关注。羊栖菜多糖(*Sargassum Fusiforme* Polysaccharides, SFPS)是从羊栖菜[*Sargassum Fusiforme* (Hary) Setch.]的全藻中分离得到的多糖。近年来, 关于 SFPS 及马尾藻科植物有效成分的抗肿瘤作用及其机制的研究已有报道^[1,2], 并证实具有一定的抑瘤作用, 而其抗肿瘤作用的机制复杂, 尚未阐明。在试验中, 我们已发现 SFPS 在体外能显著抑制人大肠癌细胞系 lovo 细胞, 并通过诱导其凋亡来实现。在此基础上, 通过 caspase-3、caspase-8、caspase-9 活性的检测, 初步探讨 SFPS 体外诱导 lovo 细胞凋亡的机制, 为开发有效的中药资源提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 细胞培养

人大肠癌细胞系 lovo 细胞(购于中科院上海生化细胞所细胞库), 贴壁培养于含 10% 胎牛血清(杭州四季青产品)的 DMEM/F-12 (Gibco 产品)培养液中, 在 37 °C、5%CO₂, 饱和湿度的培养箱中培养。

1.2 MTT 试验

取对数生长期细胞接种于 96 孔板上, 每孔 100 μl, 密度为 10⁵ 个/ml。SFPS(由本研究所提取并鉴定)以 D-Hanks 液配成 20 g/L 的储存液, 4 °C 冰箱保存, 使用时以培养液稀释成不同浓度(1 000 mg/L、500 mg/L、300 mg/L、50 mg/L 和 5 mg/L)加入 96 孔板, 分别培养 24 h、36 h、48 h、72 h。每孔 100 μl, 每组设 6 个复孔, 对照组加入等体积培养液。实验中止前 4 h 每孔加入 20 μl 四甲基唑氮蓝(MTT, Amresco 分装产品), 培养结束时倾去培养液, 加入 150 μl DMSO, 完全显色后, 以酶联免疫检测仪在 550 nm 波长, 测 A 值, SAS 软件进行统计学处理后, 按下列公式计算抑制率:

抑制率 = (1 - 实验组平均 A 值 / 对照组平均 A 值) × 100%。

1.3 DNA 提取和琼脂糖凝胶电泳

取对数生长期细胞, 以 10⁵ 个/ml 接种于 50 ml 培养瓶中培养, 加入 SFPS 使终浓度分别为 5 mg/

收稿日期: 2005-09-06 接受日期: 2005-11-18

浙江省中医药科研基金和浙江大学医学院青年基金资助项目

* 现在温州医学院工作

** 通讯作者。Tel: 0571-87217451, E-mail: lijichen@zju.edu.cn

L、50 mg/L、300 mg/L、500 mg/L 和 1 000 mg/L，24 h 后按 DNA 梯形条带提取试剂盒(北京鼎国生物公司产品)说明书提取 DNA。取 3.5×10^{-4} ml 所制备的样品用 0.8% 琼脂糖(Sigma 公司产品)凝胶电泳，UV 灯下观察、摄影。

1.4 细胞形态学观察

取对数生长期细胞以 10^5 个/ml 接种于 50 ml 培养瓶中培养，加入 SFPS 使终浓度为 300 mg/L。72 h 后收集细胞，按常规方法制备透射电镜和扫描电镜标本，TECNAL-10 透射电镜和 STEREOSCAN 260 扫描电镜观察，摄影。

1.5 膜联蛋白(annexin) V-FITC/PI 检测细胞凋亡率

取对数生长期细胞，以 10^5 个/ml 接种于 50 ml 培养瓶中培养。以正常培养 24 h 的细胞作为对照组，设置药物剂量梯度(5 mg/L、50 mg/L、300 mg/L 和 500 mg/L SFPS)和时间作用梯度(12 h、24 h、48 h、72 h)。收集细胞样品，生理盐水洗涤。按膜联蛋白 V-FITC/PI 试剂盒(德国 BM 公司)说明书处理：PBS 洗 3 次，将细胞重悬于 200 μ l 缓冲液，加入 10 μ l 膜联蛋白 V-FITC 和 5 μ l PI，避光室温反应 15 min，再加入 300 μ l 缓冲液，混匀后室温温育 15 min，上机检测。

1.6 Western 印迹检测 caspase-3、caspase-9 的变化

取对数生长期细胞，以 10^5 个/ml 接种于 50 ml 培养瓶中培养。以正常培养 24 h 的细胞作为对照组，设置药物剂量梯度(5 mg/L、50 mg/L、300 mg/L 和 500 mg/L SFPS)和时间作用梯度(12 h、24 h、48 h、72 h)。收集细胞样品，生理盐水洗涤。按常规方法提取蛋白质，紫外分光光度法测定蛋白质浓度。加入 5 μ l 5 \times 上样缓冲液(0.312 mol/L Tris-HCl pH 6.8, 50% 甘油, 10% SDS, 0.25% 溴酚蓝, 25% β -巯基乙醇)。煮沸 5 min 后，进行 SDS-PAGE (10% 分离胶, 4% 浓缩胶)，按蛋白质含量测定结果每孔加入 50 μ g 蛋白质，恒压 100 V 电泳至分离胶底部，转移到 PVDF 膜上。封闭过夜后，按照蛋白质标准(marker) (Invitrogen 公司)切割 PVDF 膜，

并分别加入 1:500 稀释的羊抗人 β 肌动蛋白多克隆抗体(Santa Cruz 公司)，兔抗人 caspase-3 多克隆抗体(博士德生物有限公司)和鼠抗人 caspase-9 多克隆抗体(Cell Signaling)，摇床上振摇 2 h，PBS-T(3.48 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/L KH_2PO_4 , 8 g/L NaCl, 0.2 g/L KCl, 1 ml/L Tween-20, pH 7.2)洗涤 3 次，每次 15 min。再分别加入 1:1 000 稀释的兔抗羊 IgG-HRP, 羊抗兔 IgG-HRP 和兔抗鼠 IgG-HRP(北京鼎国生物公司)，摇床上振摇 1 h，PBS-T 洗涤 3 次，ECL 试剂(Pierce 公司)显色、曝光。

1.7 RT-PCR 检测 caspase-3 mRNA 的表达

取对数生长期细胞，以 10^5 个/ml 密度接种于 50 ml 培养瓶中培养。以正常培养 24 h 的细胞作为对照组，设置药物剂量梯度(5 mg/L、50 mg/L、300 mg/L 和 500 mg/L SFPS)和时间作用梯度(12 h、24 h、48 h、72 h)。收集细胞样品，生理盐水洗涤。参照 Trizol 试剂盒说明(Invitrogen 公司)提取细胞总 RNA。用紫外分光光度仪测定 A_{260}/A_{280} ，比值在 1.9~2.0 之间，计算 RNA 含量。按 RT-PCR 试剂盒(Invitrogen 公司)操作获取 cDNA。PCR 反应体系 25 μ l，含 2 μ l cDNA 范本，2.5 μ l 10 \times 缓冲液，1.5 μ l 2.5 mmol/L MgCl_2 ，1.0 μ l 2.5 mmol/L 4 \times dNTPs，5 μ mol/L caspase-3 上、下游引物^[3](引物设计见表 1)各 0.5 μ l，10 μ mol/L homo β 肌动蛋白上、下游引物各 0.5 μ l，0.5 U Taq DNA 聚合酶。Caspase-3 和 homo β 肌动蛋白共扩反应参数为：94 $^\circ\text{C}$ 5 min；94 $^\circ\text{C}$ 1 min，62 $^\circ\text{C}$ 1 min，72 $^\circ\text{C}$ 1 min 32 循环；最后 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳，经 GIS 凝胶图像处理系统计算条带光密度值。细胞 caspase-3 mRNA 表达水平以其与 β 肌动蛋白光密度比值来表示。

1.8 Caspase-3、caspase-8、caspase-9 的活性检测

取对数生长期细胞，以 10^5 个/ml 密度接种于 50 ml 培养瓶中培养。以正常培养 24 h 的细胞作为对照组，设置药物剂量梯度(5 mg/L、50 mg/L、300 mg/L 和 500 mg/L SFPS)和时间作用梯度(12 h、24 h、48 h、72 h)。收集细胞样品，生理盐水

Table 1 PCR primers and amplified products

PCR primers	Sequence (5' to 3')	Amplified products
Homo β -actin forward sequence	GACTACCTCATGAAGATC	496 bp
reverse sequence	GATCCACATCTGCTGGAA	
Caspase-3 forward sequence	CAAACCTTTTCAGAGGGGATCG	272 bp
reverse sequence	GATCCACATCTGCGAA	

洗涤。按试剂盒(Caspase Colorimetric Assay Kit)使用说明操作。主要步骤为: 加细胞裂解缓冲液, 冰上放置 10 min, 离心(10 000 g, 1 min), 取上清液, 检测总蛋白量, 稀释 100 μ g 总蛋白到 50 μ l 细胞裂解液中, 再加 50 μ l 2 \times 反应缓冲液和 5 μ l 相应的偶联底物, 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h, 在分光光度计上以波长 405 nm 检测(即为 caspase 的相对活性)。

1.9 统计学处理

试验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组间比较采用 SPSS 12.0 for Windows 软件包中的 one-way ANOVA, 组间两两比较采用 LSD 和 SNK 检验。

2 结果

2.1 MTT 试验

SFPS 作用于 lovo 细胞后, 对细胞的增殖具有一定的抑制作用。如图 1A 所示, 在不同浓度的 SFPS 作用下, 时间的延长并没有显著改变抑制率: 当浓度范围为 5~50 mg/L 时, 抑制率随药物作用时间的延长有逐渐升高的趋势; 当 300~1 000 mg/L 时, 基本维持在药物作用 24 h 后的抑制率。而如图 1B 所示, 随着 SFPS 浓度的增加, 抑制作用明显加强, 具有一定的剂量依赖性。尤其当浓度

在 500~1 000 mg/L 时, 曲线陡然升高, 杀伤率高达(91.8 \pm 3.1)%, 表明抑制率发生了显著变化(图 1B)。

2.2 凋亡细胞的 DNA 断裂

不同浓度 SFPS 处理 lovo 细胞 24 h 的 DNA 凝胶电泳结果如图 2 所示, 在 5 mg/L SFPS 处理 24 h 后, 即诱导细胞产生典型的 DNA 梯形条带, 呈 180~200 bp 整数倍递增。随着药物浓度的增高, SFPS 浓度增高达 500 mg/L 时, DNA 梯形条带模糊, 开始出现“涂片状”(smear), 表明过高剂量的 SFPS 可在诱导凋亡的同时, 导致部分细胞坏死。

2.3 电镜下凋亡细胞超微结构的改变

正常培养的 lovo 细胞多呈梭形, 有丰富的微绒毛和丝状伪足(图 3A), 而且细胞器结构完整, 核内染色质分布均匀(图 3B)。经 300 mg/L SFPS 诱导 72 h 后, 可观察到一系列凋亡特征性的形态学改变: lovo 细胞收缩变圆, 伪足和微绒毛消失(图 3C); 核内染色质边集, 沿核膜内侧分布, 胞质中有空泡形成(图 3D); 细胞表面突出起泡, 与细胞分离(图 3E); 胞浆内, 可见片层状内质网轻微扩张, 线粒体肿胀, 但结构完整(图 3F)。

2.4 膜联蛋白 V-FITC/PI 检测细胞早期凋亡率

早期凋亡细胞膜上磷脂对称性的改变使得磷脂酰丝氨酸(PS)暴露于细胞膜外, PS 可特异结合标记有异硫氰酸荧光素(FITC)的膜联蛋白 V (Annexin V), 但细胞仍然维持其胞膜的完整, 因此使变性染色质

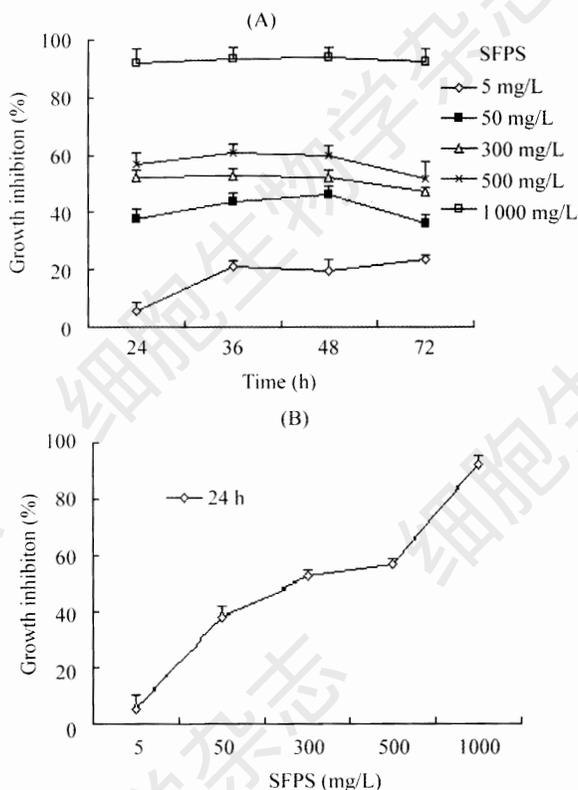


Fig. 1 The proliferation inhibition of SFPS on lovo cells

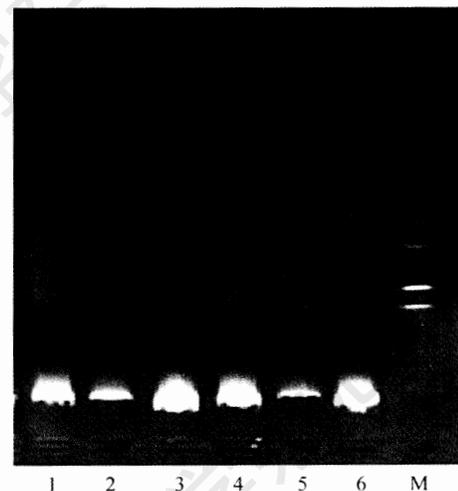


Fig.2 DNA agarose gel electrophoresis of lovo cells treated by SFPS with different concentrations for 24 h

1-5: lovo cells treated by 1 000, 500, 300, 50 and 5 mg/L of SFPS respectively for 24 h; 6: control; M: marker.

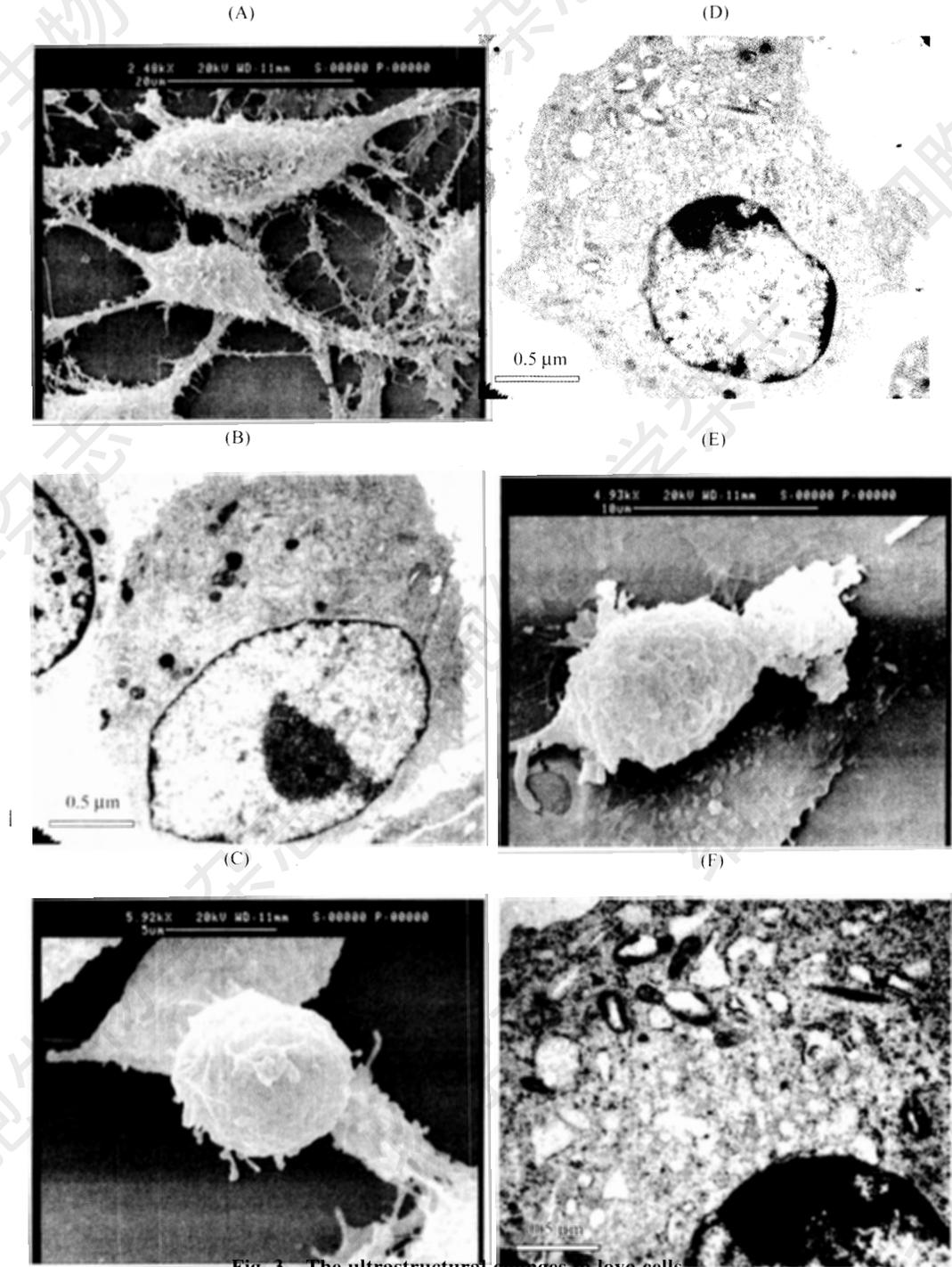


Fig. 3 The ultrastructural changes in lovo cells

A, B: control; C-F: lovo cells treated with 300 mg/L SFPS for 72 h.

着色的PI不能进入细胞内。在流式细胞术双参数散点图(图4)上:左下限a显示活细胞(LL:膜联蛋白V⁻/PI⁻);右上象限c是非活细胞,即坏死细胞(UR:膜联蛋白V⁺/PI⁺);而右下象限b为凋亡细胞(LR:膜联蛋白V⁺/PI⁻)。从表2可见,在一定浓度范围内,随着浓度的升高,凋亡率逐渐升高,其中在300 mg/L SFPS作用凋亡率高达20.58%。而随着浓度的继续升高,细胞的凋亡率反而下降,可能引起细胞

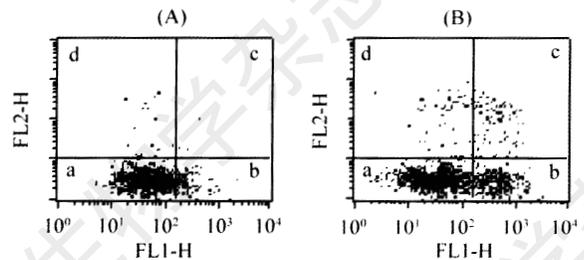


Fig. 4 Flow cytometric analysis of apoptosis

A: control; B: lovo cell treated with 300 mg/L of SFPS for 72 h.

坏死。在 300 mg/L SFPS 作用下, 细胞凋亡率也相应的升高, 具有时间的依赖性(表 2), 但同时随着作用时间的延长, 细胞坏死也增加。

2.5 Caspase-3 酶原蛋白的表达水平

Western 印迹结果显示(图 5A, 图 5B), 不同浓度的 SFPS 处理 lovo 细胞 24 h 后, caspase-3 酶原蛋白带变细, 并随浓度增加, caspase-3 酶原与 β 肌动蛋白的光密度积分值之比逐渐减小(图 5C), 即 caspase-3 酶原裂解增加。300 mg/L SFPS 处理 lovo 细胞 12、24、48 和 72 h 后, caspase-3 酶原蛋白带也变细, 而随着时间延长, caspase-3 酶原与 β 肌动蛋白的光密度积分值之比也逐渐减小(图 5D)。可见, caspase-3 酶原蛋白的裂解, 随着药物作用

浓度的升高, 药物作用的时间延长而增强。

2.6 Caspase-3 基因 mRNA 的表达水平

RT-PCR 结果显示(图 6A, 图 6B), 不同浓度的 SFPS 处理 lovo 细胞 24 h, caspase-3 与 β 肌动蛋白共扩增的 PCR 产物条带比值逐渐增高, 表明随着药物浓度的增加, caspase-3 mRNA 的表达提高。300 mg/L SFPS 处理 lovo 细胞 12, 24, 48 和 72 h 后, caspase-3 与 β 肌动蛋白共扩增的 PCR 产物条带比值也逐渐增高(图 6C, 图 6D), 表明随着药物作用时间的延长, caspase-3 mRNA 的表达也逐步提高。

2.7 Caspase-9 酶原的激活

Western 印迹结果显示(图 7), 不同浓度的 SFPS 处理 lovo 细胞 24 h 后, caspase-9 酶原(47 kDa)

Table 2 The ratio of apoptotic lovo cells after SFPS treatment

Groups	Quad % gated				Groups	Quad % gated			
	a	b	c	d		300 mg/L	a	b	c
24 h					Control	96.01	1.81	0.51	1.67
Control	97.60	2.05	0.29	0.06	12 h	77.91	11.78	5.22	5.09
5 mg/L	72.61	12.50	5.06	9.83	24 h	71.10	24.63*	2.98	1.29
50 mg/L	63.91	23.15*	7.49	5.45	48 h	61.34	30.60*	5.45	2.62
300 mg/L	63.41	20.58*	4.71	11.30	72 h	49.90	43.74*	3.22	3.15
500 mg/L	65.42	19.03*	4.92	10.63					

* $P < 0.01$ vs control group. The number in bold indicated the ratio of early apoptotic lovo cells.

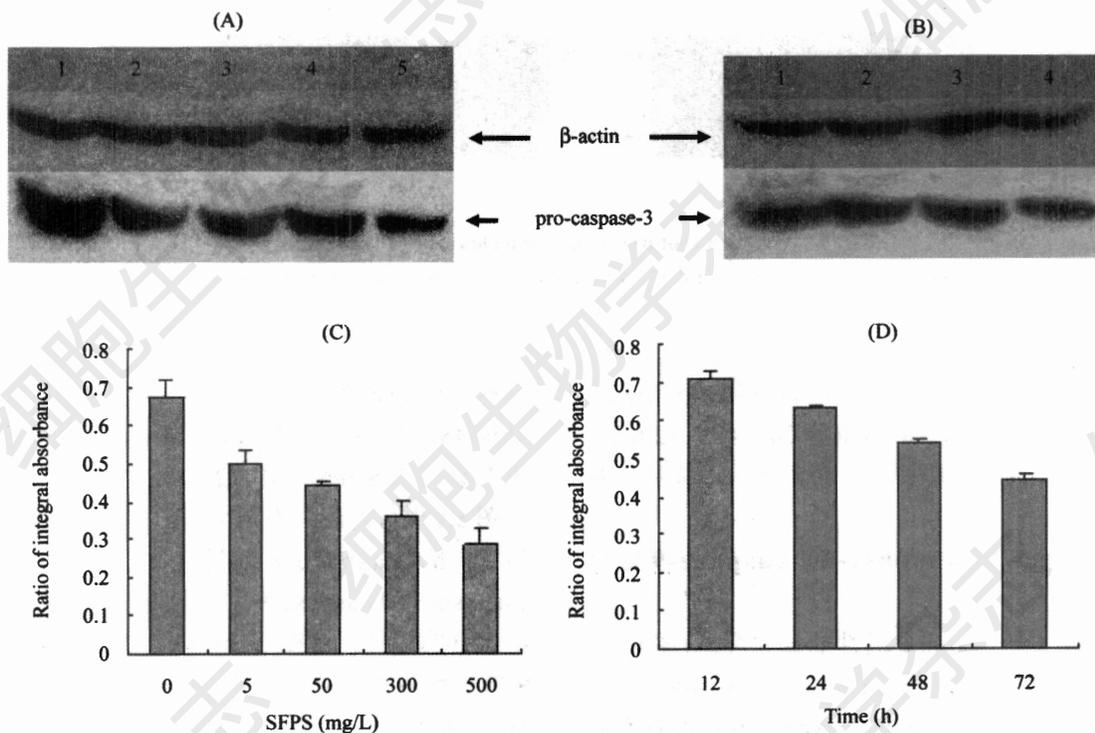


Fig. 5 Western blot analysis of pro-caspase 3 and β -actin of lovo cells treated with SFPS

(A) 1-5: lovo cells treated with 0, 5, 50, 300 and 500 mg/L SFPS for 24 h; (B) 1-4: lovo cells treated with 300 mg/L SFPS for 12, 24, 48 and 72 h, respectively; (C), (D): ratio of integral absorbance between pro-caspase 3 and β -actin.

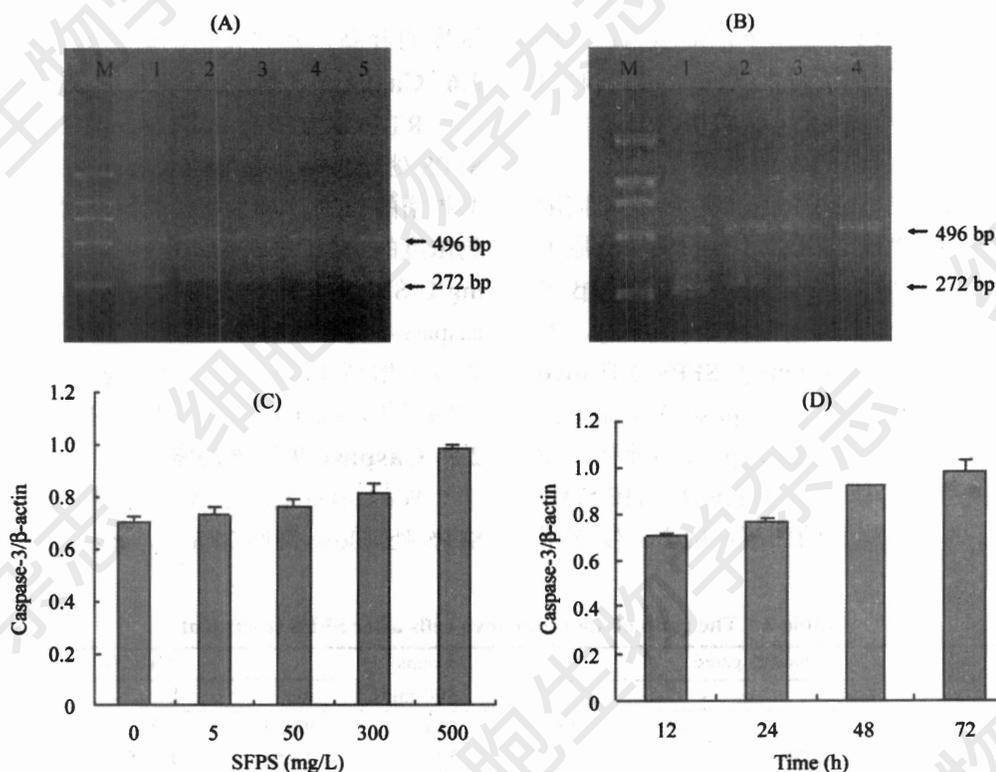


Fig. 6 RT-PCR analysis of caspase-3 mRNA of lovo cells treated with SFPS

(A) 1-5: lovo cells treated with 500, 300, 50, 5 and 0 mg/L SFPS for 24 h, respectively; (B) 1-4: lovo cells treated with 300 mg/L SFPS for 72, 48, 24 and 12 h; (C), (D): ratio of mRNA content between caspase-3 and β -actin.

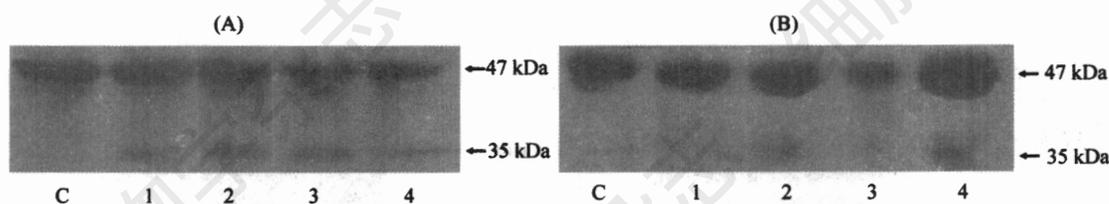


Fig. 7 Western blot analysis of the cleavage of pro-caspase-9

(A) 1-4: lovo cells treated with 5, 50, 300 and 500 mg/L SFPS for 24 h; (B) 1-4: lovo cells treated with 300 mg/L SFPS for 12, 24, 48 and 72 h, respectively. C: control.

被激活发生裂解, 形成较大的活性片段(35 kDa)。在 300 mg/L SFPS 处理 lovo 细胞 24、48、72 h 后, 也可发现 caspase-9 被激活发生裂解, 形成活性片段。

2.8 Caspase-3、caspase-8、caspase-9 活性的检测

比色法检测 caspase 活性的结果显示(图 8B), 300 mg/L SFPS 处理 lovo 细胞 12、24、48、72 h 后, caspase-3、caspase-8、caspase-9 活性均有时间依赖性增高的趋势。Caspase-9 的活性是在 300 mg/L SFPS 作用 24 h 后才明显高于对照组。而 caspase-3 的活性, 在 12 h 仍明显低于 caspase-9,

同样浓度处理 24 h 后才高于 caspase-9, 甚至于在处理 48、72 h 后显著提高。但 caspase-8 活性变化不明显, 当 SFPS 作用 72 h 后才明显高于对照组。从图 8A 也可看出, 不同浓度的 SFPS 作用 lovo 细胞后 24 h, caspase-8 的活性并没有显著改变, 而 caspase-3 和 caspase-9 的活性相较于对照组, 有逐渐上升的趋势。这提示 SFPS 作用后, 启动 caspase-9 酶原被激活, 裂解形成活性片段进而激活下游效应 caspase-3。

3 讨论

SFPS 是一种重要的天然大分子物质, 有文献

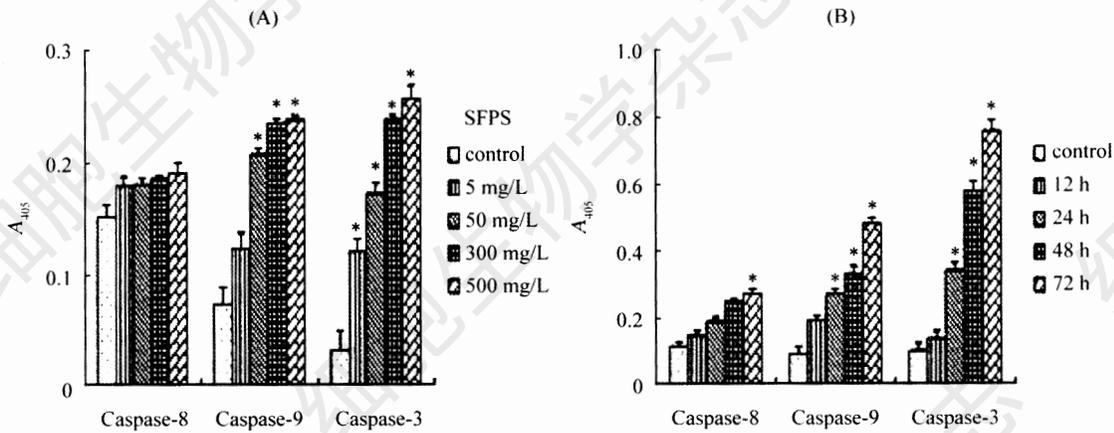


Fig.8 The activity of caspase-3, caspase-8 and caspase-9

(A) lovo cells treated with 0, 5, 50, 300 and 500 mg/L SFPS for 24 h; (B) lovo cells treated with 300 mg/L SFPS for 0, 12, 24, 48 and 72 h, respectively.

报道 SFPS 不仅对荷瘤小鼠红细胞膜上 C_3b 受体有直接作用, 还能调节血清中红细胞免疫抑制因子和免疫促进因子的含量和活性, 对红细胞免疫具有明显促进作用, 对淋巴细胞白血病 P388 小鼠红细胞免疫亦有促进作用。我们近期研究^[4]发现 SFPS 在一定浓度范围内, 诱导人早幼粒白血病细胞系 HL-60 细胞和人大肠癌 lovo 细胞凋亡来达到抑制肿瘤体外增殖的目的。

在原来的工作基础上进一步研究, 本实验试图揭示 SFPS 诱导 lovo 细胞凋亡的分子机制及信号转导通路。在 MTT 法中我们观察到 SFPS 可显著抑制 lovo 细胞生长增殖, 并且具有明显的量效关系, 即浓度越大抑制作用越强。而不同浓度的 SFPS 对 lovo 细胞处理 24 h 后即达到最高峰, 随着药物处理时间的延长, 细胞增殖状态基本没有发生明显的变化, 维持在抑制高峰。

另外, 实验进一步通过细胞形态、凝胶电泳及流式细胞术证实 SFPS 作用后的 lovo 细胞均出现典型的凋亡现象, 推测 SFPS 在体外是通过启动细胞凋亡来达到抗肿瘤的目的。在膜联蛋白 V-FITC/PI 流式细胞术检测中, 发现 300 mg/L SFPS 作用 24 h 后, 细胞的凋亡率高达 24.63%。在一定浓度范围内, SFPS 作用 lovo 细胞后, 凋亡细胞百分率随着浓度增加和时间延长而增加。在 MTT 中 SFPS 作用 lovo 细胞 24 h 后可发现 500~1 000 mg/L 曲线陡然升高, 但凋亡率反而下降, 这更说明 SFPS 浓度超过一定范围后, 细胞发生坏死。

凋亡程序化死亡除在神经系统发育和维持免疫系统的正常功能具有重要作用外, 还与肿瘤的发

生发展及复发等有一定的联系。细胞凋亡过程至少从功能上可划分为 3 个明显不同的阶段, 即启动期、效应期和降解期, 而 caspase 激活是细胞凋亡效应期的一个十分重要的生化事件, 对于 caspase 依赖的细胞凋亡相关疾病, caspase 有可能作为治疗这些疾病的靶点。比色法检测 caspase 活性的结果显示, caspase-9 的活性是在 300 mg/L SFPS 作用 24 h 后才明显高于对照组。而 caspase-3 的活性, 在 12 h 仍明显低于 caspase-9, 同样浓度处理 24 h 后才高于 caspase-9, 甚至于在处理 48、72 h 后显著提高。其中 caspase-8 的活性并没有显著改变。另外, 在 Western 印迹检测中也发现了 caspase-9 酶原被激活形成的活化片段, 提示 SFPS 作用后, 启动 caspase-9 酶原被激活, 裂解形成活性片段, 进而激活下游效应 caspase-3 向下逐级级联诱导 lovo 细胞凋亡, 达到抑制 lovo 细胞增殖的效果。

正常情况下^[5], 胞质中的 caspase-9 以无活性的酶原形式存在, 当细胞接受到外界凋亡信号后, caspase-9 的前体与胞质中的细胞色素 c 和 Apaf-1 结合在一起形成凋亡体, 这个复合体进而激活 caspase-9, 紧接着活化的 caspase-9 可以剪切并激活 caspase-3, 使 caspase-3 活性增加。Budihardjo 等^[6]报道, 少量 caspase-8 的激活就可以促使线粒体释放细胞色素 c。而在 SFPS 诱导 lovo 细胞凋亡的过程中, caspase-9 的激活是由于 caspase-8 的激活促使线粒体释放细胞色素 c, 还是 SFPS 直接可以使线粒体释放细胞色素 c, 尚有待进一步的研究。

总之, SFPS 对 lovo 细胞的增殖有明显的抑制作用, 其抑制作用是通过 SFPS 诱导 lovo 细胞发生

凋亡来实现的。在 SFPS 诱导 lovo 细胞凋亡的过程中, caspase-9 的活化片段参与了 caspase-3 的激活, 进而使得活化的 caspase-3 介导了 lovo 细胞发生凋亡的信号通路, 从而促使凋亡的发生。

目前, 临床化疗药物不仅使肿瘤细胞产生耐药性, 而且患者因放化疗毒副作用导致的造血系统和免疫功能的抑制, 影响肿瘤患者的营养状态和正常生理。Wang 等^[7]在体内实验中, 发现从中药里提取的多糖对肿瘤细胞无直接杀伤作用, 而是通过启动免疫系统抑制肿瘤细胞增殖。在体外, 我们也针对正常人胃黏膜上皮细胞, 进行细胞杀伤实验, 发现 SFPS 在范围为 5~5 000 mg/L 内对其均无明显杀伤力。这表明 SFPS 对正常细胞无毒性甚至有一定的

保护作用, 而对肿瘤细胞有高效的杀伤或抑制作用。我们的研究只表明了 SFPS 在体外诱导 lovo 细胞凋亡, 达到抗 lovo 的效果, 对于药物在体内代谢后成分结构的生物转化或代谢未能进一步研究。这也提示我们将通过体内实验进一步探索 SFPS 抗肿瘤的机制。

参考文献 (References)

- [1] Sogawa K *et al. Life Sci*, 2000, **66**: PL227
- [2] Sogawa K *et al. Life Sci*, 2002, **71**: 2575
- [3] Donoghues *et al. Cancer Res*, 1999, **59**: 5386
- [4] 梁 倩等。实验生物学报, 2004, **37**: 125
- [5] Yuan J *et al. Cell*, 2004, **116**: S53
- [6] Budihardjo I *et al. Annu Rev Cell Dev Biol*, 1999, **15**: 269
- [7] Wang JC *et al. Kaohsiung J Med Sci*, 2001, **17**: 461

Apoptosis in Lovo Cells Induced by SFPS was Associated with a Activation of Caspase-3 Mediated by Caspase-9

Lin-Lin Yan, Qian Liang*, Ji-Cheng Li**

(Institute of Cell Biology, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China)

Abstract Human colorectal cancer (lovo) cells were chosen to study the anti-tumor effects of *Sargassum fusiforme* polysaccharides (SFPS) and explore the significance of caspase-3, caspase-8 and caspase-9 in the apoptosis of lovo cells induced by SFPS. Inhibition of the cell proliferation was measured by MTT assay. SFPS induced apoptosis of lovo cells was observed by electron microscopy, flow cytometry and DNA electrophoresis. And the expressions of caspase-3 mRNA and pro-caspase-3, caspase-9 were tested by RT-PCR and Western blot. Furthermore, caspase-3, caspase-8, caspase-9 protease activity was measured by colorimetric assay kit. The results suggested that SFPS exhibited obvious anti-proliferative activity. Morphological examination, DNA ladders and flow cytometry analysis obviously showed cell apoptosis with characteristic morphological changes and DNA fragmentation. Furthermore, the expression of pro-caspase-3 decreased and the level of caspase-3 mRNA increased with the time and dose-dependent manner. However, Western analysis also showed the cleavage of caspase-9, an initiator caspase in SFPS-treated cells. Otherwise, caspase activity assay suggested that SFPS could induce cell apoptosis, which was closely accompanied with increase caspase-3 and caspase-9 activation. In conclusion, our study suggested that SFPS could induce the apoptosis of lovo cells *in vitro* resulting in the inhibition of proliferation and SFPS-induced apoptosis was associated with activation of caspase-3 mediated by cleavage of caspase-9.

Key words *Sargassum fusiforme* polysaccharides; lovo cell; apoptosis; caspase-3, caspase-8 and caspase-9

Received: September 6, 2005 Accepted: November 18, 2005

This work was supported by the Scientific Research Foundation of Zhejiang Province for Chinese Medicine and the Excellent Young Talented Person by the Zhejiang University Medical School

*Present at Wenzhou Medical College

**Corresponding author. Tel: 86-571-87217451, E-mail: lijichen@zju.edu.cn